

06-06-00  
A. Dac



EXPRESS MAIL NO. EK715864038US

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application of Jürgen Behrens and Walter Birchmeier

ATTORNEY USER NO.:

Filed on June 5, 2000



**23622**

PATENT TRADEMARK OFFICE



For CONDUCTINE PROTEIN AND A RELATED AGENT  
FOR DIAGNOSING AND TREATING TUMOR ILLNESSES

Attorney's Docket 0107-026P

Box New Patent Application - No Fee  
Hon. Commissioner of Patents and Trademarks  
Washington DC 20231

Sir:

NEW PATENT APPLICATION

Enclosed herewith for filing is a 10 page application (in German) comprised of specification, 21 claims, and 10 sheets of drawing.

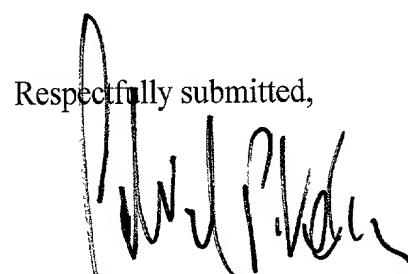
The priority of German patent application No. 197 38 205.3 filed on September 2, 1997, is hereby claimed, the contents of which are incorporated herein by reference thereto. A certified copy will be filed in due course.

The filing fee and all other documents, including the English translation, will be filed later.

Gabriel P. Katona L.L.P.  
708 Third Avenue, 14th Floor  
New York, New York 10017

(212) 370-4000 Phone  
(212) 370-7336 Fax

Respectfully submitted,

  
Gabriel P. Katona  
Attorney for Applicant  
Registration No. 20,829

WO 99/11780

PCT/DE98/02621

1

## CONDUCTINPROTEIN UND VERWANDTES MITTEL ZUR DIAGNOSE UND ZUR THERAPIE VON TUMOR-ERKRANKUNGEN

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft neue Wege zur Bekämpfung von Tumorerkrankungen durch Ausnutzung molekularbiologischer Zusammenhänge bei der Tumorentstehung. Sie betrifft im einzelnen ein Mittel zur Diagnose von Tumorerkrankungen, und darauf aufbauend ein Mittel zur Therapie. Sie betrifft ferner das neue Protein Conductin, seine Mutanten und Varianten sowie Teile davon, die dazu analogen cDNA-Sequenzen und deren Verwendung in gentherapeutischen und pharmakologischen Verfahren.

Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Cadherine und Catenine bilden Zelladhäsionskomplexe, die in zahlreichen Geweben für die Anheftung der Zellen aneinander verantwortlich sind. Die Cadherine sind Transmembranproteine und stellen den direkten Kontakt zwischen benachbarten Zellen her. -  $\alpha$ ,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin sind zytoplasmatische Komponenten, die die Cadherine mit dem Aktin-Zytoskelett verbinden. Neben der Funktion bei der Zelladhäsion haben Catenine auch eine entscheidende Rolle bei Signaltransduktionsprozessen.  $\beta$ -Catenin in Vertebraten und das homologe Segmentpolaritäts-Genprodukt Armadillo in Drosophila werden durch den Wnt/Wingless-Signalweg stabilisiert (Nusse, R., Cell 89, 321-323, 1997). Dies führt zu einer Erhöhung der zytoplasmatischen, nicht an Cadherin gebundenen Fraktion dieser Proteine, die daraufhin mit HMG-Transkriptionsfaktoren der LEF-1/TCF-Familie wechselwirken können. Als Resultat wird  $\beta$ -Catenin/Armadillo in den Zellkern transportiert, wo es zusammen mit den LEF/TCF-Proteinen an DNA bindet und bestimmte Gene aktiviert (Behrens, J. et. al., Nature 382, 638-642, 1996).

Dieser Signalweg spielt auch eine Rolle bei der Tumorentstehung. In Kolonepithelzellen wird der zytoplasmatische Pool von  $\beta$ -

WO 99/11780

PCT/DE98/02621

2

Catenin durch das Tumorsuppressor-Genprodukt APC (Adenomatosis Polyposis Coli) streng reguliert. Mutationen von APC, wie sie in etwa 80% aller Kolonkarzinome auftreten, führen zu verkürzten Formen des APC Proteins, die nicht mehr in der Lage sind  $\beta$ -Catenin zu destabilisieren. Dadurch findet man in diesen Tumoren permanente Komplexe von  $\beta$ -Catenin mit dem HMG-Transkriptionsfaktor TCF-4, welche für die Transformation der Zellen verantwortlich gemacht werden. Diese Theorie wird gestützt durch den kürzlichen Befund, daß in Tumoren, in denen APC nicht verändert ist, Mutationen von  $\beta$ -Catenin auftreten. Diese führen ebenfalls zur zytoplasmatischen Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin und zur Assoziation mit LEF-1/TCF-Faktoren (Morin, P.J. et. al., Science 275, 1787-1790).

Die Erfindung hat das Ziel, einen neuen Weg zur Verhinderung der Tumorentstehung zu finden. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Kontrolle der Regulation von  $\beta$ -Catenin in Körperzellen zu entwickeln.

Gegenstand der Erfindung ist ein neues Protein, welches an  $\beta$ -Catenin bindet und zu dessen zytoplasmatischen Abbau führt. Dieses Protein hat die Aminosäuresequenz gemäß Abb. 1 und wurde als CONDUCTIN bezeichnet.

Das Erfindung beruht nun auf der eigenen Erkenntnis, daß Conductin über eine  $\beta$ -Catenin-Bindungsdomäne an  $\beta$ -Catenin, über eine GSK 3 $\beta$ -Bindungsdomäne an GSK 3 $\beta$  und über eine sogenannte RGS-Domäne (Regulator of G-Protein Signalling) an APC-Fragmente bindet. Dadurch kommt es zum zytoplasmatischen Abbau von  $\beta$ -Catenin und in Vertebraten zur Blockade des Wnt/Wingless-Signalwegs. Damit ist klar, daß Conductin ein wichtiger Regulator der  $\beta$ -Catenin-Funktion ist und im Zusammenspiel mit APC zur Tumorsuppression beiträgt.

Davon abgeleitet betrifft die Erfindung ein Mittel zur Diagnose von Tumorerkrankungen, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß das Vorhandensein und die Menge von Conductin, seiner Mutanten und Varianten oder seiner Teile in Körperzellen nachgewiesen

wird. Dieser Nachweis kann auf der Proteinebene mit spezifischen Antikörpern durchgeführt werden, speziell mit monoklonalen Antikörpern.

Die Diagnose von Tumorerkrankungen kann gemäß der Erfindung auch auf der Genebene erfolgen. Dazu werden mit ausgewählten Primern und cDNA-Sonden, die aus der Gensequenz des Conductins abgeleitet sind,

- das Gen, das für Conductin, seine Mutanten und Varianten oder Teile davon kodiert, bzw.
- mRNA-Sequenzen, die von diesen Genen abgelesen werden, nachgewiesen.

Das erfindungsgemäße Mittel zur Therapie von Tumorerkrankungen enthält Substanzen, die die Wirkung des Conductins im Körper aktivieren/reaktivieren. Das sind vor allem Mittel, die den Genpromoter des Conductins aktivieren bzw. Mittel, die die Stabilität der von den Conductin-Genen abgeleiteten m-RNA-Sequenzen erhöht. Das Hauptziel aller dieser Mittel besteht erfindungsgemäß darin, die Aktivität des Conductins in den Körperzellen zu erhöhen. Dazu kommen u. a. kleinmolekulare Substanzen in Betracht, die z. B. durch High-Throughput-Number-Screening gefunden werden.

Die Erfindung umfaßt auch gentherapeutische Mittel, enthaltend Gene, die für Conductin, seine Mutanten und Varianten oder Teile davon kodieren, bzw. mRNA-Sequenzen, die von diesen Genen abgelesen werden.

Unter Schutz gestellt wird ferner das neue Protein Conductin gemäß Abb. 1 - SEQ ID No. 1, seine Mutanten und Varianten sowie Teile davon. Besonders bevorzugte Teilsequenzen sind die Aminosäuren 78-200 (RGS) - SEQ ID No. 2, 343-396 (GSK 3β-Bindungsdomäne) - SEQ ID No. 3, 397-465 (β-Catenin-Bindungsdomäne) - SEQ ID No. 4 und 783-833 (Dishevelled Homologie-Region) - SEQ ID No. 5. Zum Schutzmfang gehören auch Teilsequenzen des Adenomatosis Poliposis Coli (APC),

WO 99/11780

PCT/DE98/02621

4

gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenzen 1464-1604, 1516-1595, 1690-1778 und 1995-2083 als RGS-Domänen-Interaktionsorte.

Gleichermaßen beansprucht werden die analogen cDNA-Sequenzen, insbesondere die volle cDNA-Sequenz des Conductins (Basenpaare 1-2825) gemäß Abb. 2 - SEQ ID No. 6 sowie die Teilsequenzen des Conductins der Nukleotidfolge 446-814 (RGS-Genabschnitt) - SEQ ID No. 7, der Nukleotidfolge 1241-1402 (Genabschnitt der GSK 3 $\beta$ -Bindungsdomäne) - SEQ ID No. 8, 1403-1609 (Genabschnitt der  $\beta$ -Catenin-Bindungsdomäne) - SEQ ID No. 9 und der Nukleotidfolge 2561-2713 (Genabschnitt der Dishevelled Homologie-Region) - SEQ ID No. 10.

Die Erfindung wird durch die folgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert.

Conductin wurde durch einen Hefe 2-Hybrid Screen als  $\beta$ -Catenin-Interaktionspartner identifiziert. Die vollständige cDNA-Sequenz wurde daraufhin isoliert und sequenziert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von Conduction ist in Abb. 1 gezeigt, die Nukleotidsequenz in Abb. 2 und die Gegenüberstellung von Aminosäure- und Nukleotidsequenz in Abb. 3. Conductin besteht aus 840 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 92,8 kDa. Durch Sequenzvergleiche wurde im Conductin eine RGS-Domäne (Aminosäuren 78-200) und eine zu dem Protein Dishevelled verwandte Domäne (Aminosäuren 783-833, Dishevelled Homologie-Region) identifiziert (Abb. 1-3). Die GSK 3 $\beta$ - und  $\beta$ -Catenin-Bindungsdomänen (Aminosäuren 343-396 bzw. 397-465) wurden durch Interaktionsstudien im 2-Hybrid-System entdeckt (Abb. 4). Es zeigte sich, daß diese Domänen ausreichend und notwendig für die Bindung an GSK 3 $\beta$  bzw.  $\beta$ -Catenin sind (Abb. 4), wohingegen die RGS- und Dishevelled Homologie-Region nicht beteiligt sind. Die Wechselwirkung von Conductin mit GSK 3 $\beta$  bzw.  $\beta$ -Catenin wurde auch in Co-Immunpräzipitationsexperimenten biochemisch bewiesen.

Die Wirkung von Conductin auf  $\beta$ -Catenin wurde in SW480 Zellen untersucht. In diesen Zellen ist das Tumor-Suppressor-Genprodukt

WO 99/11780

PCT/DE98/02621

5

APC mutiert, wodurch es zu einem Anstieg des cytoplasmatischen und vor allem nukleären Gehalts von  $\beta$ -Catenin kommt. Die Einbringung von Conductin in diese Zellen führt zu einem drastischen Abbau von  $\beta$ -Catenin, wodurch die Zelle von cytoplasmatischem und im Zellkern befindlichen  $\beta$ -Catenin depletiert wird (Abb. 4). Diese Wirkung auf den Gehalt von  $\beta$ -Catenin ist gleich stark wie die von nichtmutiertem APC, woraus geschlossen werden kann, daß Conductin ebenfalls als Tumorsuppressor durch Regulation von  $\beta$ -Catenin wirkt. Es wurde außerdem gezeigt, daß Conductin den Wnt/Wingless-Signalweg auch in Xenopus-Embryonen durch seine Wirkung auf  $\beta$ -Catenin hemmt.

Es wurde außerdem festgestellt, daß Conductin mit APC direkt interagiert. APC-Fragmente von Aminosäure 1464-1604, 1516-1595, 1690-1778 und 1995-2083 wurden als Interaktionsstellen für Conductin identifiziert. In Conductin erfolgt die Bindung an APC über die RGS-Domäne; dieser Bereich ist ausreichend und notwendig für die Interaktion. Die anderen Domänen in Conductin sind nicht beteiligt (Abb. 4).

故其子曰：「吾父之子，其名何也？」

WO 99/11780

PCT/DE98/02621

6

**Legende zu den Abbildungen:****Abb. 1****Aminosäuresequenz von Conductin**

Die Conductin cDNA kodiert ein Protein von 840 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 92,8 kDa. Die RGS-Domäne (doppelt unterstrichen), die  $\beta$ -Catenin-Bindungsdomäne (einfach unterstrichen) und die Dishevelled Homologie-Region sind durch Fettdruck hervorgehoben.

**Abb. 2****Nukleotidsequenz von Conductin von Position 1-2825**

Die Sequenzbereiche sind analog zu Abb.1 markiert.

**Abb. 3****Gegenüberstellung von Aminosäure- und Nukleotidsequenz von Conductin****Abb. 4****Analyse der Interaktion von Conductin und seinen Teilen mit  $\beta$ -Catenin, APC und GSK 3 $\beta$** 

Das Conductin Protein und abgeleitete Teilstücke sind schematisch dargestellt. Hervorgehoben sind die RGS-Domäne (RGS), die GSK 3 $\beta$ -Bindungsdomäne (GSK BD) und die  $\beta$ -Catenin-Bindungsstelle ( $\beta$ -BD). Die Interaktion mit  $\beta$ -Catenin mit den APC Fragmenten von Aminosäure 1464-1604 (APCfr.1) und 1516-1595 (APCfr. 2) und GSK 3 $\beta$  wurde im Hefe 2-Hybrid Assay untersucht und als  $\beta$ -Galaktosidase Einheiten quantifiziert. Man erkennt, daß die Bindung an  $\beta$ -Catenin auf die  $\beta$ -Catenin-Bindungsstelle beschränkt ist, die anderen Teile des Proteins tragen dazu nicht bei. Die Analyse zeigt außerdem die ausschließliche Interaktion von APC mit der RGS-Domäne von Conductin. Vergleichbare Ergebnisse für die Bindung an die RGS-Domäne wurden mit APC Fragmenten von Aminosäure 1690-1778 und 1995-2083 erhalten. Der

WO 99/11780

PCT/DE98/02621

7

Abbau von  $\beta$ -Catenin in SW480 Zellen durch Conductin wurde nach transienter Expression der angegebenen Proteine und Immunfluoreszenz-Färbung von  $\beta$ -Catenin analysiert. Nur Teilstücke von Conductin, die an  $\beta$ -Catenin binden, führen zu dessen Abbau. Die Analyse zeigt schließlich die Bindung von GSK 3 $\beta$  an die GSK 3 $\beta$ -Bindungsdomäne von Conductin.

[REDACTED]

patentan/mdl 9713 ansp. doc

(Aktenzeichen)

**Patentansprüche**

1. Mittel zur Diagnose von Tumoren, enthaltend eine Substanz, mit der
  - Conductin gemäß Abb. 1 oder Teile davon bzw.
  - Gene, die für Conductin oder Teile davon kodieren, bzw.
  - mRNA-Sequenzen, die von diesen Genen abgelesen werden, nachgewiesen werden.
2. Mittel zur Diagnose von Tumoren nach Anspruch 1, enthaltend spezifische Antikörper gegen Conductin oder Teile davon.
3. Mittel zur Diagnose von Tumoren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die spezifischen Antikörper monoklonale Antikörper sind.
4. Mittel zur Diagnose von Tumoren nach Anspruch 1, enthaltend korrespondierende Oligonukleotid-Primer bzw. DNA-Sonden zum Nachweis der Gene und deren Mutationen.
5. Mittel zur Diagnose von Tumoren nach Anspruch 1, enthaltend korrespondierende Oligonukleotid-Primer bzw. DNA-Sonden zum Nachweis der RNA-Sequenzen.
6. Mittel zur Therapie von Tumoren, enthaltend eine Substanz, die die Wirkung des Conductins im Körper aktiviert/reaktiviert.
7. Mittel nach Anspruch 6, enthaltend eine Substanz, die den Genpromoter des Conductins aktiviert.
8. Mittel nach Anspruch 6, enthaltend eine Substanz, die die Stabilität der mRNA-Sequenzen erhöht.
9. Mittel nach Anspruch 6, enthaltend eine Substanz, die die Aktivität des Conductins erhöht.

10. Conductin, gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz 1-840 gemäß Abb. 1 (SEQ ID No. 1), wobei Abb. 1 Bestandteil dieses Anspruchs ist.
11. Teilsequenz des Conductins nach Anspruch 10, gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz 78-200 (RGS-Domäne) der Abb. 1 (SEQ ID No. 2).
12. Teilsequenz des Conductins nach Anspruch 10, gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz 343-396 (GSK 3B) der Abb. 1 (SEQ ID No. 3).
13. Teilsequenz des Conductins nach Anspruch 10, gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz 397-465 ( $\beta$ -Catenin-Bindungsdomäne) der Abb. 1 (SEQ ID No. 4).
14. Teilsequenz des Conductins nach Anspruch 10, gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz 783-833 (Dishevelled Homologie-Region) der Abb. 1 (SEQ ID No 5).
15. Teilsequenzen des Adenomatosis Poliposis Coli (APC), gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenzen 1464-1604, 1516-1595, 1690-1778 und 1995-2083 als RGS-Domänen-Interaktionsorte.
16. cDNA-Sequenz des Conductins der Nukleotidfolge 1-2825 der Abb. 2 (SEQ ID No. 6), wobei Abb. 2 Bestandteil dieses Anspruchs ist.
17. cDNA-Teilsequenz des Conductins der Nukleotidfolge 446-814 (RGS-Genabschnitt) der Abb. 2 (SEQ ID No. 7).
18. cDNA-Teilsequenz des Conductins der Nukleotidfolge 1241-1402 (Genabschnitt der GSK 3B-Bindungsdomäne) der Abb. 2 (SEQ ID No. 8).

10

19. cDNA-Teilsequenz des Conductins der Nukleotidfolge 1403-1609 (Genabschnitt der  $\beta$ -Catenin-Bindungsdomäne) der Abb. 2 (SEQ ID No. 9).

20. cDNA-Teilsequenz des Conductins der Nukleotidfolge 2561-2713 (Genabschnitt der Dishevelled Homologie-Region) der Abb. 2 (SEQ ID No. 10).

21. Verwendung des Conductin-Gens für die Gentherapie von Tumorerkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß ein Vektor mit dem Conductin-Gen konstruiert wird, anschließend ein Gentransfer in den menschlichen Körper erfolgt und damit die Aktivität des Conductins in Körperzellen wiederhergestellt wird.

WO 99/11780

PCT/DE98/02621

1/10

MSSAVLVTLPPDSSSFREDAPRPPVPGEEGETPPCQPSVGKVQSTKPMVSSNARRNED 60  
 GLGEPEGRASPDSPLTRWTKSLHSLLGQDGAYLFRTFLEREKCDTLDWFACNGFROM 120  
NLKDTKTLRVAKAIYKRYIENNSVVSQQLPATKTYIRDGIKKOOIGSVMFDQAOTEIQA 180  
VMEENAYQVFLTSIDIYLEYVRSGGENTAYMSNGGLGSLKVLCGYLPTLNEEEWTCA 240  
CKLSPTVVGSSKTLRATASVRSTETAENGFRSFKRSVPVNPyHVGSGYVAPATSANDS 300  
ELS DAL TDDSMSMTDSSVDGVPYRMGSKKQLQREMRSVKANGQVSLPHFPRTHRLPK 360  
EMTPVEPAFAELISRLEKLKLELESRESLEERLQQIREDEEKEGSEQALSSRDGAPVQ 420  
HPLALLPSGSYEEPDQTIILDDHLSRVLKTPGCQSPGVGRYSPRSRSPDHHQHHHQCH 480  
TLLSTGGKLPPVAACPLLGGKSFLTKQTTKIVHHYIHHAVPKTKEEIEAATQRVRCL 540  
CPGGTDYYCYSKCKSHPKAPEFLPGEQFCGSRGGTLPKRNAGTEPGLALSARDGGMSSA 600  
AGGPQLPGEEGDRSQDVWQWMLSERQSKSKPMSAQSIRKSYPLESARAAAPGERVSRHL 660  
LGASCHRSRVARAHPTQDPAMPLTPPNTLAQLEEACRRLAEVSKPQKQRCCVASQRD 720  
PNWSAAGQAGASPFAFPLSLAPEDHKEPKKLASVHALQASELVVTYFFCGEEIPYRSMKA 780  
QSLTLGHFKEQLSKKGNYRYYFFKASDEFACGAVFEEIWDDETVLPMYEGRILCKVERID 840

Abb. 1

WO 99/11780

PCT/DE98/02621

2/10

CAGCCGTCTCGCAATGGATTCTGGGGCCACCCGGAGGCCAGGGCTCCGGCTCCCCAAAGG 60  
 AGAGCTTGTGCTGAAAGAGAGGAGGCTCACATGAGCCCTGCTGACTTAAGAGAGACCA 120  
 AGCCGATIGCTGAGAGGAACCTGGAAAGAAGAAAAGGAGGAGGAGGGAAAAAGCAAAAC 180  
 AAAATCCAAACTCAGTGAGACGCTCTCCCTCACCATGAGTGCGCCGIGTTAGTGACTCT 240  
 CCTTCCAGATCCAGCAGCAGCTCCGAGGGATGCTCCGCGGGCCCCGGTCCGGGAGA 300  
 AGAAGGGAGACCCACCGTGTAGCCAGGCTCAAGGTCCAGTCCACCAAACCTAT 360  
 GCCCGTTCTCTTAATGCTAGCCGGAAATGAACATGGACTGGGGAGCCCGAGGGCGGGC 420  
 CTCCTCCGATCTCCCTTGTGACCGAGTGGACCAAGTCTTACACTCTTGTGGGTGACCA 480  
GGATGGTGCATACCTCTTCCGGACTTCTGGAGAGGGAGAAATGTGTTGATACGGCTGGA 540  
CTTCTGGTTGCTTGTAAATGGGTTAGGGCAGATGAAACCTGAAAGGATACCAAAACTTTGCG 600  
AGTGGCCAAAGCAATCTATAAGAGGTACATTGAGAACACAGCGTTGCTCCAAACACT 660  
GAAGCCCCGCCACCAAGACCTACATAAGGAGATGGCATCAAGAACAGATCGGCTCGGT 720  
CATGTTTGACCAAGGGCACAGACCGAGATCCAGGCACTGATGGAGGAAATGCCCTACCAAGGT 780  
GTTCTTGAACCTCTGACATTACCTGGAATATGTGAGGAGTGGGGGGAAACACAGCTTA 840  
 CATGAGTAACGGGGACTGGGAGCCTAAAGGCTTATGTTGCTACCTCCCCACCTTGAA 900  
 TGAAGAAAGGGAGTGGACGTGCGACTCAAGTGCAAAACTCTCACCCACCGGGTTGG 960  
 CTGTCAGCAAAACTCTTCCGGCCACCGCGAGTGAGATCCACGGAAACAGCTGAAAAA 1020  
 CGGATTCAAGTCTTCAAGAGAACCGACCCAGTCATCTTATCACGTAGGTCCGGCTA 1080  
 TGTCCTTGCACCAAGCCACCGCGCCAAACGACAGCGAGTATCCAGCGACOACTGACCGA 1140  
 CGAATCCATGTCATGACGGACAGTAGCCTAGATGGAGTCCCTCTTACCGCATGGGAG 1200  
 TAAGAAAACAGCTCCAGAGAGAGATGCACTGCACTGTGAGGCAATGGCCAAGTGTCTCT 1260  
ACCTCAATTCTCGAGAACCCACCGCTGCCAACGGAGATGACGCCCTGTGAAACCTGCTGC 1320  
CTTCGCCGCCAGCTCATCTCAGGCTGGAGAAACTGAAACTGGAGCTGGAAAGCCGCCA 1380  
TAGTCGGAGGAGCGGCTGCAGCAGATCCGGGAGGATGAAAGAAAAGGAGGGGTCTGAGCA 1440  
GGCCCTGAGCTCACGGATGGAGCACCGTCCAGCACCCCCCTGGCCCTCTACCCCTCCGG 1500  
CACCTATGAAGAGGACCCACAAACATTGGACGACCACCTCTCAGGTCCCTCAAGAC 1560  
CCCCGGCTGTCATCCCCCTGGTGTGGTCGCTACAGCCCACGGTCCCGCTCCCCCGACCA 1620  
CCACCAACAGCACCACCACTAGCAGTGTCAATACCCCTCTCTGACTGGGGCAAGCT 1680  
GCCCCCCCTGGCTCTGCTTGGAGGCAAGAGCTTCTGACCAACAGACGAC 1740  
GAAGCACGTTACCAACCACTACATCCACCAACCGCCGCTCCCAAGACCAAGGAGGAGA 1800  
CGAGGCAGAAGCCACACAGAGAGTCGCTGCCCTGTCCTGGGGAAACAGATTATTTG 1860  
CTACTCAAATGCAAAAGCCACCCGAAGCTCCAGAGCCCCCTGCTGGGAGCAGTTTG 1920  
TGGCAGCAGAGGTGGTACCTGCAAAACCGAAATGCAAAAGGGCACCGAACGGGTCTTGC 1980  
ACTGTCGGCCAGGGATGGAGGGATGTCAGTGCAGGGGGGGCCCCAGCTCTGGGG 2040  
AGAAGGGAGACGGGTACAGGAATGCTGGCAGTGGAGTGTGGAGAGTGGAGGGAGCAA 2100  
GTCCAAGCCCCATAGTGCCTAAAGCATAAGAAAGCTACCCATGGACTCTGCCGTGC 2160  
GGCCCCAGGAQAACGAGTCAGCGGCCACCATCTGTTGGGGCCAGCGGACACTCCGCTC 2220  
AGTGGCCCGGGCTACCCATTTACCCAGGACCCCTGCAATGCCCTCCCTAACCCACCAA 2280  
CACTTGGCACAGCTAGAGGAAGCCTGCCAGGCTGCGAGGGTGTGCAAGCCCCAGAA 2340  
GCAGGGCTCACCCCTGCCAACCAAGCTGGCTCCAGAAGATCACAAAGGCCAAAGAA 2400  
AGGAGCCCTACCCCTGCCAACCAAGCTGGCTCCAGTGGAGTGTGCACTTCTGTTG 2460  
ACTGGCAAGTGTCCACGCCCTCCAGGCCAGTGGAGTGTGCACTTCTGTTG 2520  
AGAAGAAAATCATAACAGGAGGATGCTGAGGCTCAAGCTTGTACCCCTGGGCCACTTCAA 2580  
GGAGCAGCTCAGAAAAAGGAAATTACAGGTATTATTCAGAAGAGGCAAGTACGAAATT 2640  
TGCTCTGGGAGCAGTTTGAGGAGATCTGGGACGACGGAGACAGTGCTCCCCATGTACGA 2700  
AGGCAGGATCTGGGCAAAAGTGGAGAGGATGACTGAGCTTGGCTCTGGCGTGCAA 2760  
CTGGGCAAGCACCTCGCGTGCACCATGGAGCCAGAGACCCCTGCTCAGGCC 2820  
TACGC 2825

Abb. 2

WO 99/11780

PCT/DE98/02621

3/10

215	ATG	AGT	AGC	GCC	GTG	TTA	GTG	ACT
1	M	S	S	A	V	L	V	T
CTC	CTT	CCA	GAT	CCC	AGC	AGC	AGC	TTC
L	L	P	D	P	S	S	S	F
CGC	GAG	GAT	GCT	CCG	CGG	CCC	CCG	GTT
R	E	D	A	P	R	P	P	V
CCG	GGA	GAA	GAA	GGG	GAG	ACC	CCA	CCG
P	G	E	E	G	E	T	P	P
TGT	CAG	CCT	AGT	GTG	GGC	AAG	GTC	CAG
C	Q	P	S	V	G	K	V	Q
TCC	ACC	AAA	CCT	ATG	CCC	GTT	TCC	TCT
S	T	K	P	M	P	V	S	S
AAT	GCT	AGG	CGG	AAT	GAA	GAT	GGA	CTG
N	A	R	R	N	E	D	G	L
GGG	GAG	CCC	GAG	GGG	CGG	GCC	TCC	CCC
G	E	P	E	G	R	A	S	P
GAT	TCC	CCT	TTG	ACC	AGG	TGG	ACC	AAG
D	S	P	L	T	R	<u>W</u>	<u>T</u>	<u>K</u>
TCT	TTA	CAC	TCC	TTG	TTG	GGT	GAC	CAG
<u>S</u>	<u>L</u>	<u>H</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>G</u>	<u>D</u>	<u>Q</u>
GAT	GGT	GCA	TAC	CTC	TTC	CGG	ACT	TTC
<u>D</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>R</u>	<u>T</u>	<u>F</u>
CTG	GAG	AGG	GAG	AAA	TGT	GTG	GAT	ACG
<u>L</u>	<u>E</u>	<u>R</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	<u>C</u>	<u>V</u>	<u>D</u>	<u>T</u>
CTG	GAC	TTC	TGG	TTT	GCT	TGT	AAT	GGG
<u>L</u>	<u>D</u>	<u>F</u>	<u>W</u>	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>N</u>	<u>G</u>

Abb. 3

WO 99/11780

PCT/DE98/02621

4/10

TTC	AGG	CAG	ATG	AAC	CTG	AAG	GAT	ACC
<u>F</u>	<u>R</u>	<u>Q</u>	<u>M</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>D</u>	<u>T</u>
AAA	ACT	TTG	CGA	GTG	GCC	AAA	GCA	ATC
<u>K</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>I</u>
TAT	AAG	AGG	TAC	ATT	GAG	AAC	AAC	AGC
<u>Y</u>	<u>K</u>	<u>R</u>	<u>Y</u>	<u>I</u>	<u>E</u>	<u>N</u>	<u>N</u>	<u>S</u>
GTT	GTC	TCC	AAG	CAG	CTG	AAG	CCC	GCC
<u>V</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>P</u>	<u>A</u>
ACC	AAG	ACC	TAC	ATA	CGA	GAT	GGC	ATC
<u>T</u>	<u>K</u>	<u>T</u>	<u>Y</u>	<u>I</u>	<u>R</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>I</u>
AAG	AAG	CAA	CAG	ATC	GGC	TCG	GTC	ATG
<u>K</u>	<u>K</u>	<u>O</u>	<u>Q</u>	<u>I</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>V</u>	<u>M</u>
TTT	GAC	CAG	GCA	CAG	ACC	GAG	ATC	CAG
<u>F</u>	<u>D</u>	<u>Q</u>	<u>A</u>	<u>Q</u>	<u>T</u>	<u>E</u>	<u>I</u>	<u>Q</u>
GCA	GTG	ATG	GAG	GAA	AAT	GCC	TAC	CAG
<u>A</u>	<u>V</u>	<u>M</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>N</u>	<u>A</u>	<u>Y</u>	<u>Q</u>
GTG	TTC	TTG	ACT	TCT	GAC	ATT	TAC	CTG
<u>V</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>D</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>
GAA	TAT	GTG	AGG	AGT	GGG	GGG	GAA	AAC
<u>E</u>	<u>Y</u>	<u>V</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>E</u>	<u>N</u>
ACA	GCT	TAC	ATG	AGT	AAC	GGG	GGA	CTG
<u>T</u>	<u>A</u>	<u>Y</u>	<u>M</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>L</u>
GGG	AGC	CTA	AAG	GTC	TTA	TGT	GGC	TAC
<u>G</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>
CTC	CCC	ACC	TTG	AAT	GAA	GAA	GAG	GAG
<u>L</u>	<u>P</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>

Abb. 3

WO 99/11780

PCT/DE98/02621

5/10

TGG	ACG	TGT	GCC	GAC	CTC	AAG	TGC	AAA
W	T	C	A	D	L	K	C	K
CTC	TCA	CCC	ACC	GTG	GTT	GGC	TTG	TCC
L	S	P	T	V	V	G	L	S
AGC	AAA	ACT	CTT	CGG	GCC	ACC	GCG	AGT
S	K	T	L	R	A	T	A	S
GTG	AGA	TCC	ACG	GAA	ACA	GCT	GAA	AAC
V	R	S	T	E	T	A	E	N
GGA	TTC	AGG	TCC	TTC	AAG	AGA	AGC	GAC
G	F	R	S	F	K	R	S	D
CCA	GTC	AAT	CCT	TAT	CAC	GTA	GGT	TCC
P	V	N	P	Y	H	V	G	S
GGC	TAT	GTC	TTT	GCA	CCA	GCC	ACC	AGC
G	Y	V	F	A	P	A	T	S
GCC	AAC	GAC	AGC	GAG	TTA	TCC	AGC	GAC
A	N	D	S	E	L	S	S	D
GCA	CTG	ACC	GAC	GAT	TCC	ATG	TCC	ATG
A	L	T	D	D	S	M	S	M
ACG	GAC	AGT	AGC	GTA	GAT	GGA	GTC	CCT
T	D	S	S	V	D	G	V	P
CCT	TAC	CGC	ATG	GGG	AGT	AAG	AAA	CAG
P	Y	R	M	G	S	K	K	Q
CTC	CAG	AGA	GAG	ATG	CAT	CGC	AGT	GTG
L	Q	R	E	M	H	R	S	V
AAG	GCC	AAT	GGC	CAA	GTG	TCT	CTA	CCT
K	A	N	G	Q	V	S	L	P
CAT	TTT	CCG	AGA	ACC	CAC	CGC	CTG	CCC
H	F	P	R	T	H	R	L	P

Abb. 3

ERSATZBLATT (REGEL 26)

WO 99/11780

PCT/DE98/02621

6/10

AAG GAG ATG ACG CCT GTG GAA CCT GCT  
K E M T P V E P A

GCC TTC GCC GCC GAG CTC ATC TCC AGG  
A F A A E L I S R

CTG GAG AAA CTG AAA CTG GAG CTG GAA  
L E K L K L E L E

AGC CGC CAT AGT CTG GAG GAG CGG CTG  
S R H S L E E R L

CAG CAG ATC CGG GAG GAT GAA GAA AAG  
Q Q I R E D E E K

GAG GGG TCT GAG CAG GCC CTG AGC TCA  
E G S E O A L S S

CGG GAT GGA GCA CCG GTC CAG CAC CCC  
R D G A P V O H P

CTG GCC CTC CTA CCC TCC GGC AGC TAT  
L A L L P S G S Y

GAA GAG GAC CCA CAA ACC ATT TTG GAC  
E E D P Q T I L D

GAC CAC CTC TCC AGG GTC CTC AAG ACC  
D H L S R V L K T

CCC GGC TGT CAA TCC CCT GGT GTG GGT  
P G C O S P G V G

CGC TAC AGC CCA CGG TCC CGC TCC CCC  
R Y S P R S R S P

GAC CAC CAC CAC CAG CAC CAC CAC CAT  
D H H H Q H H H H

Abb. 3

WO 99/11780

PCT/DE98/02621

7/10

CAG	CAG	TGT	CAT	ACC	CTT	CTT	TCG	ACT
Q	Q	C	H	T	L	L	S	T
GGG	GGC	AAG	CTG	CCC	CCC	GTG	GCT	GCT
G	G	K	L	P	P	V	A	A
TGC	CCC	CTC	CTT	GGA	GGC	AAG	AGC	TTC
C	P	L	L	G	G	K	S	F
CTG	ACC	AAA	CAG	ACG	ACG	AAG	CAC	GTT
L	T	K	Q	T	T	K	H	V
CAC	CAC	CAC	TAC	ATC	CAC	CAC	CAC	GCC
H	H	H	Y	I	H	H	H	A
GTC	CCC	AAG	ACC	AAG	GAG	GAG	ATC	GAG
V	P	K	T	K	E	E	I	E
GCA	GAA	GCC	ACA	CAG	AGA	GTC	CGC	TGC
A	E	A	T	Q	R	V	R	C
CTC	TGT	CCT	GGG	GGA	ACA	GAT	TAT	TAT
L	C	P	G	G	T	D	Y	Y
TGC	TAC	TCC	AAA	TGC	AAA	AGC	CAC	CCG
C	Y	S	K	C	K	S	H	P
AAG	GCT	CCA	GAG	CCC	CTG	CCT	GGG	GAG
K	A	P	E	P	L	P	G	E
CAG	TTT	TGT	GGC	AGC	AGA	GGT	GGT	ACC
Q	F	C	G	S	R	G	G	T
TTG	CCA	AAA	CGG	AAT	GCA	AAG	GGC	ACC
L	P	K	R	N	A	K	G	T
GAA	CCG	GGT	CTT	GCA	CTG	TCG	GCC	AGG
E	P	G	L	A	L	S	A	R
GAT	GGA	GGG	ATG	TCC	AGT	GCA	GCG	GGG
D	G	G	M	S	S	A	A	G

Abb. 3

ERSATZBLATT (REGEL 26)

WO 99/11780

PCT/DE98/02621

8/10

GGC	CCC	CAG	CTT	CCT	GGG	GAA	GAA	GGA
G	P	Q	L	P	G	E	E	G
GAC	CGG	TCA	CAG	GAT	GTC	TGG	CAG	TGG
D	R	S	Q	D	V	W	Q	W
ATG	TTG	GAG	AGT	GAG	CGG	CAG	AGC	AAG
M	L	E	S	E	R	Q	S	K
TCC	AAG	CCC	CAT	AGT	GCC	CAA	AGC	ATA
S	K	P	H	S	A	Q	S	I
AGA	AAG	AGC	TAC	CCA	TTG	GAG	TCT	GCC
R	K	S	Y	P	L	E	S	A
CGT	GCG	GCC	CCA	GGA	GAA	CGA	GTC	AGC
R	A	A	P	G	E	R	V	S
CGG	CAC	CAT	CTG	TTG	GGG	GCC	AGC	GGA
R	H	H	L	L	G	A	S	G
CAC	TCC	CGC	TCA	GTG	GCC	CGG	GCT	CAC
H	S	R	S	V	A	R	A	H
CCA	TTT	ACC	CAG	GAC	CCT	GCA	ATG	CCT
P	F	T	Q	D	P	A	M	P
CCC	CTT	ACC	CCA	CCC	AAC	ACT	TTG	GCA
P	L	T	P	P	N	T	L	A
CAG	CTA	GAG	GAA	GCC	TGC	CGC	AGG	CTG
Q	L	E	E	A	C	R	R	L
GCA	GAG	GTG	TCG	AAG	CCC	CAG	AAG	CAG
A	E	V	S	K	P	Q	K	Q
CGG	TGC	TGC	GTG	GCC	AGT	CAG	CAG	AGG
R	C	C	V	A	S	Q	Q	R

Abb. 3

WO 99/11780

PCT/DE98/02621

9/10

GAC	AGG	AAC	CAC	TCG	GCT	GCT	GGT	CAG
D	R	N	H	S	A	A	G	Q

GCA	GGA	GCC	TCA	CCC	TTC	GCC	AAC	CCA
A	G	A	S	P	F	A	N	P

AGC	CTG	GCT	CCA	GAA	GAT	CAC	AAA	GAG
S	L	A	P	E	D	H	K	E

CCA	AAG	AAA	CTG	GCA	AGT	GTC	CAC	GCG
P	K	K	L	A	S	V	H	A

CTC	CAG	GCC	AGT	GAG	CTG	GTT	GTC	ACC
L	Q	A	S	E	L	V	V	T

TAC	TTT	TTC	TGT	GGA	GAA	GAA	ATT	CCA
Y	F	F	C	G	E	E	I	P

TAC	AGG	AGG	ATG	CTG	AAG	GCT	CAA	AGC
Y	R	R	M	L	K	A	Q	S

TTG	ACC	CTG	GGC	CAC	TTC	AAG	GAG	CAG
L	T	L	G	H	F	K	E	Q

CTC	AGC	AAA	AAG	GGA	AAT	TAC	AGG	TAT
L	S	K	K	G	N	Y	R	Y

TAT	TTC	AAG	AAG	GCG	AGT	GAC	GAA	TTT
Y	F	K	K	A	S	D	E	F

GCC	TGC	GGA	GCA	GTT	TTT	GAG	GAG	ATC
A	C	G	A	V	F	E	E	I

TGG	GAC	GAC	GAG	ACA	GTG	CTC	CCC	ATG
W	D	D	E	T	V	L	P	M

TAC	GAA	GGC	AGG	ATC	CTG	GGC	AAA	GTG
Y	E	G	R	I	L	G	K	V

GAG	AGG	ATC	GAC	TGA	2737
E	R	I	D	Stop	

Abb. 3

WO 99/11780

PCT/DE98/02621

10/10

**Abbau von  $\beta$ -Catenin  
In SW480 Zellen**

**Interaktion mit**

**Conductin  
Konstrukte**

$\beta$ -Catenin	APC #1	APC #2	GSK3 $\beta$
1 78 200 343 396 465	220	6	9 18
840			ja
79 280	490	0	0 n.d.
			ja
	1060	0	0 670
			nein
338 472	0	190	260 0
			nein
	0	110	250 84
			nein
	0	390	390 0
			nein

Abb. 4